

Créatine kinases et transferts d'énergie dans le myocyte cardiaque

Renée Ventura-Clapier

Les créatine kinases (CK) catalysent le transfert réversible d'une liaison riche en énergie de la phosphocréatine à l'ADP. Elles sont codées par quatre gènes, deux pour les formes cytosoliques, deux pour les formes mitochondriales. Dans les cellules musculaires, le système créatine kinase qui comprend les isoformes libres et liées et leurs substrats créatine et phosphocréatine, remplit deux rôles différents : dans le muscle rapide, il maintient un niveau élevé de réserves à haute énergie, rapidement mobilisables, tout en contrôlant la concentration de l'ATP ; dans le muscle cardiaque et les muscles lents, le système assure, de plus, l'efficacité du transfert énergétique entre les lieux de production et les lieux d'utilisation. Si l'on invalide les gènes codant pour la CK cytoplasmique ou pour les deux formes, les souris ont des performances musculaires diminuées et augmentent les capacités oxydatives de leurs muscles. Dans tous les modèles animaux actuels de cardiomyopathie, l'expression et la compartimentation des créatine kinases sont altérées, empêchant, de ce fait, le myocarde malade de mobiliser sa réserve contractile.

Les créatine kinases sont plus connues comme marqueurs de l'infarctus du myocarde et de la rhabdomyolyse, ou de la différenciation cellulaire, que pour leur rôle dans l'énergétique musculaire. En physiologie musculaire, le rôle qui leur est habituellement reconnu est celui de réservoir tampon de phosphates à haute énergie dans les cellules musculaires et nerveuses. L'histoire n'est peut-être pas aussi simple.

Les créatine kinases (CK)

La créatine kinase catalyse le transfert réversible d'une liaison riche en énergie de la phosphocréatine (PCr) à l'ADP selon la réaction : $ADP + PCr + xH^+ \rightarrow ATP + \text{créatine (Cr)}$. C'est une réaction « cul-de-sac », c'est-à-dire que la PCr n'est pas substrat d'une autre enzyme et ne peut transférer son énergie que sur l'ADP. La réaction est favorisée dans le sens de la rephosphorylation de l'ATP, avec

ADRESSE

R. Ventura-Clapier : directeur de recherches au Cnrs. Inserm U. 446, Cardiologie cellulaire et moléculaire, Faculté de pharmacie, Université Paris-Sud, 5, rue Jean-Baptiste-Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

une constante d'équilibre de 166 à pH 7 [1]. Les concentrations de PCr, ATP et créatine cellulaires étant de l'ordre de la (ou les) dizaine(s) de mM, cette réaction permet de maintenir une concentration en ADP faible et de transformer des variations d'ADP de l'ordre de la dizaine de μM en variations de PCr de l'ordre de la mM, tout en maintenant la concentration en ATP constante.

Il existe quatre gènes distincts codant pour quatre monomères de CK de 41 kDa, deux formes cytosoliques appelées B et M, formant des dimères, MM, MB et BB, et deux formes mitochondriales, une ubiquitaire (mi-CKu, ou mi-CKa) et une forme présente principalement dans les muscles striés (mi-CKs ou mi-CKb) [2, 3]. Les formes mitochondriales peuvent former des dimères ou des octamères [4].

Les créatine kinases font partie de la famille des guanidinokinases et il semble que les différents gènes aient évolué à partir d'un ancêtre commun, une première duplication ayant donné un gène codant pour une CK mitochondriale et un gène codant pour une CK cytosolique, avant la séparation des échinodermes et des chordés. Deux autres duplications ont donné les autres formes apparues plus tardivement [3]. Les formes B et mi-CKu sont coexprimées dans les muscles lisses et le tissu nerveux. Les formes M et mi-CKs sont majoritaires dans les muscles striés (squelettiques et cardiaques), le muscle cardiaque contenant aussi les formes BB et MB. Les différentes isoformes de CK diffèrent non par leurs propriétés cinétiques, mais par leur localisation intracellulaire [5].

Compartmentation du système créatine kinase

La cellule musculaire est une cellule hautement différenciée, hiérarchisée et compartimentée. Des compartiments spécialisés assurent les fonctions essentielles de ces cellules: les myofibrilles assurent la contraction, le réticulum sarcoplasmique la régulation du calcium, et les mitochondries la synthèse d'ATP. Toutes ces structures sont reliées entre elles par un réseau dense de protéines du cytosquelette tandis que le cytoplasme ne représente que 10% du volume cellulaire. Au sein de cette architecture

complexe, les réactions enzymatiques et les chaînes métaboliques se produisent non pas au hasard des rencontres des substrats dans le cytosol, mais sont organisées en complexes multi-enzymatiques. L'efficacité de ces complexes provient de ce que les produits et substrats des réactions sont directement canalisés vers la réaction suivante, sans dilution dans le milieu cellulaire. Certaines cellules musculaires peuvent multiplier par 100 leurs dépenses énergétiques en quelques secondes. Des systèmes de transfert d'énergie adaptés et efficaces ont été sélectionnés par l'évolution, telle la CK dont les différentes isoformes sont associées à ces compartiments.

La CK mitochondriale. La structure tridimensionnelle de la forme octamérique de la mi-CKa de poulet a été récemment obtenue [6]. La mi-CK n'est présente que dans les mitochondries, fixée sur la face externe de la membrane interne, à proximité de l'adénine nucléotide translocase qui

importe l'ADP dans la matrice mitochondriale et exporte l'ATP [4, 7, 8]. Elle joue à la fois un rôle structural et fonctionnel dans la mitochondrie (figure 1). La créatine agit comme un accepteur de phosphate pour la respiration mitochondriale car, dans le myocarde, 95% des liaisons riches en énergie sortent de la mitochondrie sous forme de PCr. Contrairement à ce qui est observé *in vitro*, les mitochondries maintenues au sein de l'architecture cellulaire ou dans un environnement proche du milieu intracellulaire présentent une diminution de sensibilité à l'ADP, l'accepteur terminal des oxydations phosphorylantes [9, 10]. En présence de créatine, l'ATP transporté par la translocase déplace l'équilibre de la réaction et la mi-CK catalyse le transfert du phosphate de l'ATP nouvellement synthétisé sur la créatine, en échange de l'ADP qui sera repris par la translocase et stimulera la respiration [8]. Cette facilitation se traduit sur le plan cinétique par une diminution du K_m

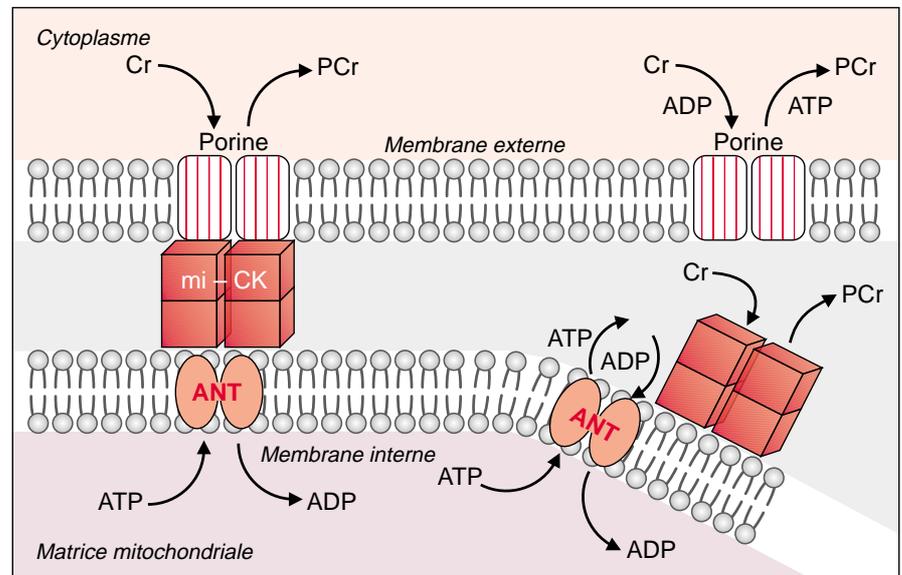


Figure 1. **Compartmentation mitochondriale de la créatine kinase.** La créatine kinase mitochondriale (mi-CK) est fixée sur la face externe de la membrane mitochondriale interne, sous forme de dimères ou d'octamères, près de la translocase (ANT). Elle peut faire partie de structures multimoléculaires joignant la membrane externe et la membrane interne, appelées sites de contact et comprenant la translocase, l'octamère de mi-CK et la porine, protéine canal de la membrane externe. Il existe un couplage fonctionnel entre la mi-CK et les phosphorylations oxydatives. L'ATP produit par la respiration mitochondriale est exporté de la matrice par la translocase, déphosphorylé rapidement par la mi-CK qui transfère la liaison phosphate sur la créatine. L'ADP produit est repris dans la matrice mitochondriale par la translocase et stimule ainsi la respiration. La phosphocréatine est exportée par la porine vers le cytoplasme.

(constante de Michaelis-Menten) apparent de la respiration pour l'ADP extramitochondrial en présence de créatine [9, 11]. Créatine kinase et translocase, en fonctionnant en interaction, créent à leur voisinage une compartimentation permettant de maintenir un rapport ATP/ADP inférieur à celui du cytoplasme et favorable aux oxydations phosphorylantes. Ce couplage nécessite la fixation de la mi-CK à proximité de la translocase et déplace la réaction de la créatine kinase de son équilibre [12].

Les CK cytosoliques. A côté de la mi-CK, d'autres isoformes sont fixées sur les différentes structures intracellulaires. On trouve la MM-CK libre dans le cytosol mais aussi fixée sur la membrane plasmique, sur le réticulum sarcoplasmique, sur les myofilaments, près des ATPases associées à ces compartiments cellulaires. La MM-CK fait partie intégrante des myofilaments en tant que protéine de structure de la bande M, reliant les filaments de myosine entre eux par sa région carboxy-terminale [13]. Des études aussi bien biochimiques que fonctionnelles ont mis en évidence l'interaction dynamique entre

l'ATPase de la myosine et la MM-CK [13, 14]. L'ATPase de la myosine, siège de la conversion de l'énergie chimique en énergie mécanique, présente une structure, des propriétés cinétiques et une régulation extrêmement complexes. Pour que cette régulation puisse fonctionner de façon optimale, l'enzyme doit être affranchie des variations de concentration de son substrat (ATP) et de ses produits (H^+ , ADP et phosphate inorganique). La limitation de diffusion de l'ATP et de l'ADP près du site ATPasique, ralentit l'ATPase, modifie sa régulation et altère les propriétés contractiles. La CK fixée à proximité du site actif, est capable d'assurer la rephosphorylation rapide de l'ADP et le contrôle local du pH, permettant ainsi une activité contractile optimale (figure 2A). La relaxation musculaire dépend de la diminution du calcium intracellulaire. Celui-ci est recapté par le réticulum sarcoplasmique (RS), grâce à une ATPase à calcium. Les études de localisation immunohistologique ont permis de montrer la présence de MM-CK sur la membrane du réticulum sarcoplasmique [15]. Des expériences sur fibres musculaires perméabilisées ou sur vésicules de RS isolées ont per-

mis de montrer que la MM-CK fixée permet le maintien d'un rapport ATP/ADP local favorable à l'ATPase assurant une capacité de captage de calcium optimale [15, 16] (figure 2B). Si la CK est une enzyme très ancienne du point de vue phylogénétique, sa compartimentation intracellulaire et l'existence de couplages fonctionnels semblent plus récentes. Cette compartimentation est pratiquement absente dans le cœur de grenouille, plus ou moins bien développée chez les oiseaux et est présente dans le tissu ventriculaire adulte de mammifère [13]. Au cours du développement, la créatine kinase mitochondriale est couplée à la respiration dès son expression dans la période périnatale alors que l'expression de la MM-CK précède sa fixation dans les myofilaments [14]. De façon générale, il semble que ce système de compartimentation apparaisse dans les cellules cardiaques hautement différenciées et se mette en place au moment de la maturation cellulaire, au cours du stade d'hypertrophie au cours duquel la complexité intracellulaire augmente et les compartiments intracellulaires tels que le réticulum sarcoplasmique et le réseau des tubules transverses se mettent en place.

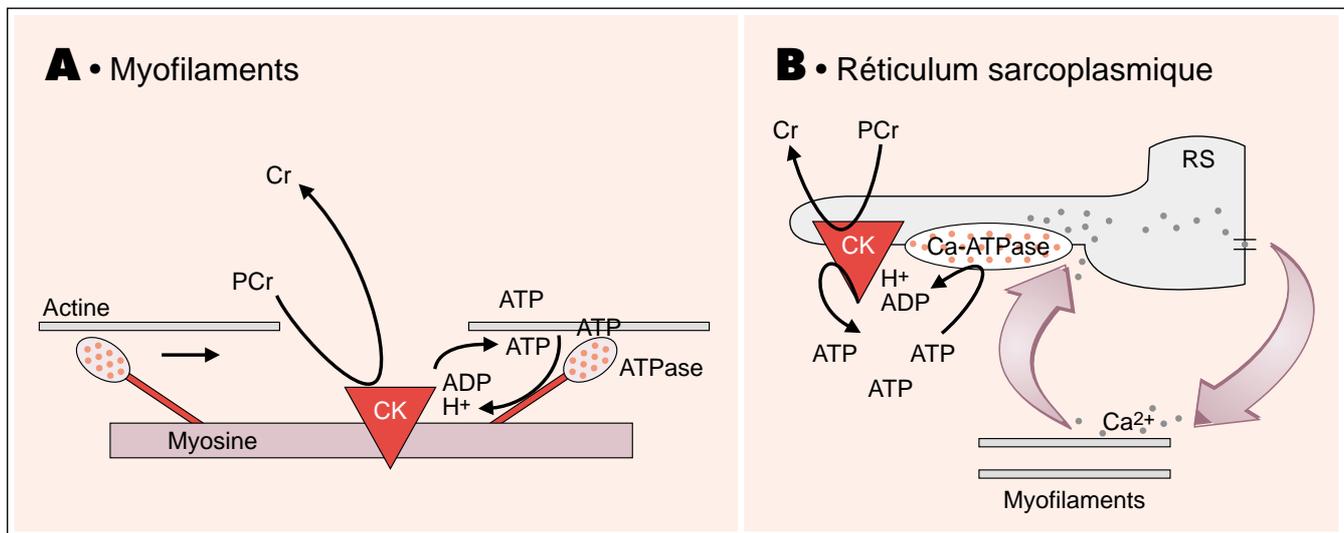


Figure 2. **Compartimentation cytoplasmique de la créatine kinase.** **A.** La créatine kinase MM (CK) est fixée dans les myofilaments sur la myosine ou elle sert de protéine d'assemblage des filaments. Elle est de plus couplée fonctionnellement à l'ATPase de la myosine qui convertit l'énergie chimique d'hydrolyse d'ATP en énergie mécanique. La MM-CK rephosphoryle localement l'ADP produit par l'ATPase, maintenant ainsi un rapport ATP/ADP local, cinétiquement et thermodynamiquement favorable à l'activité des ATPases. **B.** Dans la cellule myocardique, le réticulum sarcoplasmique (RS) assure la libération de calcium qui va activer les myofilaments et provoquer la contraction. La MM-CK est fixée sur la membrane du réticulum sarcoplasmique. Elle fonctionne en synergie avec l'ATPase qui assure le captage de calcium du cytoplasme vers la lumière du réticulum sarcoplasmique (Ca-ATPase), contrôlant ainsi la relaxation de la contraction myocardique. En rephosphorylant localement l'ADP produit par l'ATPase à calcium, la CK assure une vitesse et une efficacité optimales au transport de calcium.

Rôles du système CK

Dans ce contexte, différents rôles peuvent être attribués au système créatine kinase, rôles qui dépendent de l'activité cellulaire, des propriétés de l'enzyme, et de sa distribution intracellulaire [7, 8, 19, 20].

Rôle de système tampon temporel et spatial de l'ATP. Dans la cellule musculaire striée, parce que l'activité CK représente 10 fois ou plus l'activité de production et d'utilisation de l'ATP, la CK fonctionne globalement près de son équilibre c'est-à-dire que les vitesses de synthèse ou de dégradation sont égaux. Pour cette raison, cette enzyme agit comme un système tampon de l'ATP cellulaire et la PCr comme une forme de réservoir d'énergie, rapidement mobilisable.

Rôle thermodynamique et cinétique. En contrôlant localement les concentrations d'ADP et d'ATP, la créatine kinase assure l'efficacité cinétique des ATPases. Par ailleurs, elle maintient un potentiel de phosphorylation élevé près des enzymes et permet une libération d'énergie d'hydrolyse d'ATP maximale. Ce contrôle thermodynamique est particulièrement important pour des enzymes couplées à des gradients ioniques réversibles comme l'ATPase du réticulum sarcoplasmique.

Spécialisation de l'énergie. Les cellules musculaires, à côté de l'activité contractile, assurent d'autres fonctions qui y sont associées, telles que le maintien des gradients ioniques, les synthèses protéiques, la transmission du signal. Ces différentes activités ont des besoins énergétiques variables dans l'espace et dans le temps. Paradoxalement, une seule molécule, l'ATP, sert de pourvoyeur ubiquitaire. Le système créatine kinase, en contrôlant et interconnectant des « pools » localisés d'ATP, représente une voie métabolique spécialisée du couplage excitation-contraction. L'activation de la contraction et la mise en route des systèmes de synthèse d'énergie se font sans variation de la concentration cytosolique d'ATP et d'ADP, préservant ainsi les autres fonctions cellulaires et l'énergie libre d'hydrolyse de l'ATP.

Rôle de transfert des groupements phosphate ou navette. La compartimentation des isoformes de la créatine kinase aux sites de production et d'utilisation d'énergie, a amené plusieurs auteurs à proposer que le système créatine kinase, composé des créatine kinases et de leurs substrats, la créatine et la phosphocréatine, puisse remplir un rôle de navette entre ces sites cellulaires. Le système constitué de kinases mitochondriale et cytosolique assure le transfert des liaisons riches en énergie, des mitochondries aux sites d'utilisation et, en retour, le transfert du signal (sous forme de créatine) depuis les sites d'utilisation vers les mitochondries au travers des kinases cytosoliques, permettant ainsi une intégration efficace entre production et utilisation de l'énergie (figure 3) [7, 8].

L'existence de cette navette dans un système intégré est encore controversée. L'absence de (ou la faible) variation des flux de la créatine kinase

mesurés en résonance magnétique nucléaire (RMN) en fonction du travail musculaire a souvent été considérée comme un argument contre l'existence de la navette CK [16]. Cependant, un système efficace d'intégration entre production et utilisation d'énergie, prévoit des modifications de flux locales et s'équilibrant mutuellement, et de ce fait inaccessibles par les approches classiques de RMN. Une autre approche expérimentale permettant de suivre le marquage à l'oxygène¹⁸ des liaisons phosphates de l'ATP, a permis de mettre clairement en évidence sur le diaphragme perfusé l'augmentation des flux unidirectionnels de la CK au cours du travail [22, 23]. Ces études montrent, en outre, qu'il existe d'autres systèmes de transfert d'énergie constitués de kinases cytosoliques et mitochondriales (myokinase ou adénylyl kinase, nucléotide diphosphokinases) [19, 23].

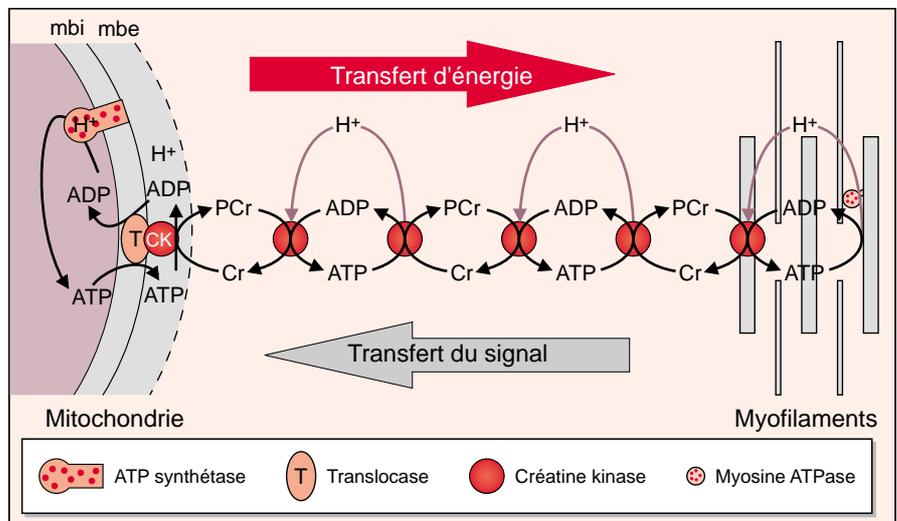


Figure 3. **La navette CK.** Dans le cardiomyocyte, la production d'énergie par les mitochondries est asservie à son utilisation par les ATPases intervenant dans le couplage excitation-contraction. En étant fixée sur les sites de production et d'utilisation d'énergie impliqués dans la contraction, les créatine kinases assurent une spécialisation des flux énergétiques. Dans les myofilaments, l'activation de la contraction entraîne une augmentation locale d'ADP aussitôt rephosphorylée par la CK fixée. Le signal ainsi transmis à la créatine circule par l'intermédiaire des CK cytosoliques vers les mitochondries et est transmis via la créatine kinase mitochondriale à la mitochondrie où il stimule la respiration. L'énergie produite est transmise par la PCr et les CK cytosoliques aux sites d'utilisation. Ce système de transfert des liaisons phosphates riches en énergie se fait de façon rapide et sans variations notables des concentrations cytosoliques des produits et substrats. Il assure une adéquation rapide entre utilisation et production d'énergie. mbi : membrane interne ; mbe : membrane externe.

Systemes CK et fonctions musculaires

Les cellules musculaires striées remplissent différents types de fonction : fonction de pompe pour le myocarde, impliquant une activité rythmique permanente, activité tonique pour les muscles de la posture, activité phasique pour les muscles de la locomotion. Pour chaque type d'activité, les cellules musculaires présentent une architecture cellulaire, un métabolisme, une composition en protéines définis. Les protéines impliquées dans les mouvements de calcium ou la contraction, font partie de familles multigéniques dont l'expression varie en fonction des tissus, au cours du développement, en fonction du type d'activité musculaire et de la demande (exercice, déconditionnement) ou dans des situations pathologiques (myopathies, cardiomyopathies). Schématiquement, deux types extrêmes de fonctionnement musculaire, assurés par deux types de muscles, lent et rapide, peuvent être décrits. Les muscles rapides (locomoteurs), à contraction intense et brève, sont rapidement fatigables quand les réserves énergétiques sont épuisées. Ils présentent une activité glycolytique importante et un métabolisme de récupération tardif, non assujéti à la demande, résumé par la formule « *twitch now, pay later* ». L'activité des muscles lents (cardiaque ou postu-

raux), à contraction soutenue ou cyclique, est assurée par la production mitochondriale d'ATP qui doit s'adapter à la demande. Ce mécanisme a été qualifié de « *pay as you go* » [24]. Tant dans ses aspects quantitatifs (concentration en substrats et activité enzymatique) que qualitatifs (diversité des isoenzymes et compartimentation), le système CK de ces muscles apparaît différent (Tableau I).

Le muscle rapide. Les muscles rapides contiennent d'importantes concentrations d'ATP et surtout de PCr et des activités CK et myokinase très élevées, assurant une réserve énergétique importante et rapidement mobilisable. Dans ces muscles, la fonction de tampon spatio-temporel du système CK va répondre à la demande intense et rapide de la contraction musculaire. Une fois les réserves énergétiques épuisées, les propriétés contractiles sont altérées. Dans ces muscles la fonction navette du système CK ne fonctionne pas, la respiration mitochondriale étant sous la dépendance de l'ADP cytosolique et non de celui produit localement par la créatine kinase [25].

Le muscle cardiaque (et lent). La nécessité d'avoir un apport soutenu en énergie pour maintenir une contraction durable et fluctuante entraîne le développement d'un compartiment mitochondrial important. On observe, dans les muscles lents, une

faible activité des kinases de transfert comme la myokinase et la CK mais dont plus de 60 % est compartimentée, et un contenu en réserves énergétiques (ATP et PCr) limité qui, compte tenu de la vitesse d'utilisation ne représente plus que quelques secondes d'activité et donc une très faible marge de sécurité. Dans ces muscles, l'activité mitochondriale doit être asservie à l'activité contractile et cela se reflète dans la relation linéaire qui existe entre le travail cardiaque et la consommation d'oxygène [26]. Ces muscles présentent une perméabilité de la mitochondrie pour l'ADP cytosolique faible, une forte activité de CK mitochondriale, permettant au signal ADP produit près des ATPases d'être transmis sous forme de créatine par les CK locales, vectorisé par la chaîne des CK cytosoliques et transmis par la CK mitochondriale aux oxydations phosphorylantes, assurant ainsi une adéquation de la production à la demande (figure 3).

Le rôle et la spécificité tissulaire du système créatine kinase ont été abordés par trois approches différentes permettant d'inhiber ou d'inactiver une de ses composantes.

Les modèles d'altération du système CK

Les analogues de créatine

La première approche a consisté à nourrir des animaux pendant plu-

Tableau I
SPÉCIFICITÉ TISSULAIRE ET DISTRIBUTION DE LA CRÉATINE KINASE

	PCr	CK	Localisation (%)		Profil isoenzymique (%)			
	mM	UI/g	cytoplasme	myofilaments	mitochondries	MM	BB	MB
Cerveau	3	400	90	–	10	–	90	
Muscle squelettique								
Rapide	30	3000	95	5	1	99	–	–
Lent	20	1500	85	15	5	95	–	–
Cœur								
Ventricule	15	800	≈ 50	23	20	55	5	20
Oreillette	10	300	≈ 60	≈ 23	6	53	11	30
Muscle lisse								
<i>Taenia coli</i>	3	150	76	23	< 1	29	50	20
Utérus gravide	4	200	80	15	5	22	65	8

sieurs semaines avec des analogues de créatine peu ou pas métabolisables (acide guanidinopropionique, cyclo-créatine...), ce qui entraîne une diminution importante du contenu cellulaire en créatine et PCr de 80 % à 90 %. De nombreuses adaptations ont été observées tant dans les muscles squelettiques que dans le myocarde. Le muscle squelettique s'adapte en augmentant ses capacités oxydatives et le myocarde en augmentant son rendement énergétique. On observe cependant une diminution des performances contractiles et une incapacité du myocarde à mobiliser une réserve contractile normale quand le travail est augmenté [27, 28].

Les inhibiteurs de créatine kinase

Ce sont des réactifs des groupements sulfhydryles et, à ce titre, peu sélectifs. Cependant, étant donné l'extrême réactivité du site actif de l'enzyme, il a été possible de les utiliser sur organe isolé par exemple. Les études récentes sur le myocarde ont mis en évidence peu de modifications de l'activité contractile basale, mais une incapacité du myocarde à mobiliser sa réserve contractile quand il est sollicité par une concentration de calcium élevée ou une stimulation β -adrénergique [29]. Par ailleurs, l'inhibition de la créatine kinase entraîne une dysfonction diastolique vraisemblablement liée à l'accumulation d'ADP dans les myofilaments ou le réticulum sarcoplasmique.

Invalidation des gènes

L'approche génétique présente l'avantage majeur de pouvoir sélectivement supprimer l'une ou l'autre des isoformes de la créatine kinase. Elle présente cependant l'inconvénient de la mise en jeu de mécanismes adaptatifs souvent difficiles à identifier et qui compliquent l'interprétation des données. Des souches de souris portant des invalidations du gène de la M-CK ($M-CK^{-/-}$), de la mi-CK ($mi-CK^{-/-}$), et des souris portant la double mutation ($CK^{-/-}$), ont été obtenues par le groupe de Wieringa (Nimègue, Pays-Bas) par recombinaison homologue dans des cellules souches [25]. Les animaux sont viables, fertiles, ne présentent pas d'altérations phénotypiques majeures et ne surexpriment pas les autres isoformes de l'enzyme. Cela montre que

la créatine kinase n'est pas une enzyme vitale au sens où son absence ne met pas en cause le bon développement et la survie de l'animal.

Les muscles et le cœur des souris $M-CK^{-/-}$ présentent des concentrations de PCr, ATP, et créatine normales et la PCr peut être utilisée pour la contraction, vraisemblablement par la mi-CK. Cependant, fonctionnellement les muscles de la patte sont incapables de s'activer efficacement au début de la période de stimulation. Cette observation montre que la CK est nécessaire lors de transitions importantes et rapides d'activité contractile. Quand la stimulation se prolonge, ces muscles présentent cependant une résistance accrue à la fatigue, liée à une augmentation du volume mitochondrial des muscles glycolytiques [25, 30]. Ces muscles, qui ne peuvent plus fonctionner correctement sur leurs réserves énergétiques et sur le système tampon, s'adaptent partiellement en augmentant leur potentiel oxydatif et glycolytique et se mettent à fonctionner sur un mode de flux tendu. Dans les muscles oxydatifs, la suppression du pôle cytosolique de la navette CK induit des modifications importantes de la régulation mitochondriale. En effet, la barrière de perméabilité pour l'ADP de la membrane mitochondriale externe est abaissée de telle façon que le signal ADP, qui n'est plus transmis par la CK cytosolique, puisse activer directement les oxydations phosphorylantes. Cela permet à la mi-CK de jouer un double jeu de synthèse de PCr ou d'ATP en fonction de la contraction [25]. Le fait de pouvoir altérer une seule isoforme a donc permis de mettre en évidence indirectement l'importance de cette fonction navette.

Les souris $mi-CK^{-/-}$ ne présentent pas d'altérations morphologiques ou fonctionnelles [32]. Chez ces animaux, la régulation mitochondriale et le couplage entre CK et oxydations phosphorylantes sont préservés, vraisemblablement par une relocalisation de la MM-CK sur la membrane mitochondriale externe, minimisant l'effet de la délétion sur le métabolisme musculaire [33].

Si les souris $CK^{-/-}$ portant la double mutation sont viables et fertiles, de profondes altérations morphologiques et fonctionnelles des muscles

squelettiques ont été décrites, qui s'ajoutent à celles observées chez les mutants $M-CK^{-/-}$. Une hypertrophie du réseau du réticulum sarcoplasmique est observée, accompagnée d'une diminution d'amplitude et de vitesse des mouvements de calcium intracellulaire au cours de l'excitation [31]. Cette observation met en lumière pour la première fois *in vivo* l'importance de la CK dans l'homéostasie calcique. Des altérations du contenu en métabolites laissent penser qu'il pourrait y avoir une redistribution des voies métaboliques chez ces animaux. En particulier, des résultats préliminaires montrent l'activation d'autres systèmes de transfert d'énergie tels que les adénylyl kinases et les guanylyl kinases [23].

D'ores et déjà les observations faites sur ces animaux semblent confirmer le double rôle de navette et tampon du système créatine kinase. Cependant peu d'études fonctionnelles ont été menées jusqu'à présent. Il est clair que l'organisme des mammifères n'a pas été sélectionné au cours de l'évolution sur la base d'une vie protégée et sédentaire d'animal de laboratoire. Les conséquences de ces invalidations ou l'efficacité des adaptations devront rapidement être étudiées dans des conditions plus proches de celles de la vie sauvage.

Le système créatine kinase en pathologie

Des altérations importantes du système créatine kinase ont été décrites dans bon nombre de modèles animaux de cardiomyopathies ou dans l'insuffisance cardiaque humaine (Tableau II). On note généralement une chute de la concentration en créatine et en phosphocréatine, une diminution de l'activité et du flux de l'enzyme et une redistribution des isoenzymes due à une diminution de la forme M et de la forme mitochondriale, accompagnées d'une surexpression de la forme fœtale (B) [34, 35]. Le couplage fonctionnel entre oxydations phosphorylantes et mi-CK est altéré dans tous les modèles étudiés [36]. Ces altérations ne semblent pas avoir de répercussions importantes sur la fonction cardiaque de base, mais entraînent une diminution de la capacité du myocarde de mobiliser sa réserve contractile quand il est

Tableau II
 SYSTÈME CK ET DÉFAILLANCE CARDIAQUE

	CK totale	BB-CK	mi-CK activité	Flux de CK couplage	Travail cardiaque
Diabète	↓	↓	↓	↓	↓
Ligature coronaire	↓	↑	↑	↓	↓
Cardiomyopathie dilatée humaine	↓	↑	↓	↓	↓
Cardiomyopathie alcoolique	↓	↑	↓	↓	↓
Cardiomyopathie du hamster	↓	↑	↓	↓	↓
Défaillance cardiaque	↓	↑	↓	↓	↓

↓ : diminution ; ↑ : augmentation ; BB-CK : créatine kinase cytosolique ; mi-CK : créatine kinase mitochondriale.

sollicité, par exemple par une augmentation du calcium extracellulaire ou de la fréquence [34]. Une corrélation a pu être observée entre réserve contractile (produit de la pression par la fréquence) et réserve énergétique (produit de l'activité CK par la concentration en substrat) [37].

Conclusions

Nos connaissances actuelles permettent de dire que le système créatine kinase présente des degrés de complexité ou d'organisation variables selon les espèces, au cours du développement embryonnaire ou en relation avec la fonction et le métabolisme du tissu considéré. En particulier dans les muscles striés on peut définir deux modes de fonctionnement, système tampon ou système navette qui peuvent co-exister et dont l'importance relative dépendra essentiellement du type de métabolisme, assujetti ou non à la demande. Ce système est adaptable en fonction des modifications à long terme de l'activité musculaire. A ce titre il fait partie intégrante du phénotype musculaire. A côté des systèmes nécessaires au développement et à la croissance de l'animal, il existe tout un ensemble de systèmes spécialisés impliqués dans les interactions de l'animal avec le milieu extérieur, dans son adaptation à son environnement, dans la lutte contre les prédateurs et la recherche de nourriture. La spécialisation, dans

les cellules musculaires, de systèmes élaborés de transferts d'énergie à côté de systèmes sophistiqués et efficaces de transformation de cette énergie en énergie mécanique, représente un avantage sélectif certain. C'est dans des situations où l'animal sera mis dans des conditions plus proches de son cadre de vie naturel que le rôle de tels systèmes élaborés de transfert d'énergie devra être appréhendé dans un avenir proche ■

RÉFÉRENCES

1. Lawson JW, Veech RL. Effects of pH and free Mg^{2+} on the K^{eq} of the creatine kinase reaction and other phosphate hydrolyses and phosphate transfer reactions. *J Biol Chem* 1979; 254: 6528-37.
2. Payne RM, Strauss AW. Expression of the mitochondrial creatine kinase genes. *Mol Cell Biochem* 1994; 133/134: 155-92.
3. Mühlebach SM, Gross M, Wirz T, Wallimann T, Perriard JC, Wyss M. Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes. *Mol Cell Biochem* 1994; 133/134: 245-62.
4. Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1102: 119-66.
5. Saks VA, Rosenshtaukh, LV, Smirnov, VN, Chazov EI. Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism. *Can J Physiol Pharmacol* 1978; 56: 691-706.
6. Fritz-Wolf K, Schnyder T, Wallimann T, Kabsch W. Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature* 1996; 381: 341-5.

7. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissue with high and fluctuating energy demands. The phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 1992; 281: 21-40.

8. Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova OY, Kuznetsov AV. Metabolic compartmentation and substrate channeling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases *in vivo* regulation of cellular respiration: a synthesis. *Mol Cell Biochem* 1994; 133/134: 155-92.

9. Saks VA, Vasil'eva E, Belikova YO, Kuznetsov AV, Lyapina S, Petrova L, Perov NA. Retarded diffusion of ADP in cardiomyocytes: possible role of mitochondrial outer membrane and creatine kinase in cellular regulation of oxidative phosphorylation. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1144: 134-48.

10. Gellerich FN, Kapischke M, Kunz W, Neumann W, Kuznetsov A, Brdiczka D, Nicolay K. The influence of the cytosolic oncotic pressure on the permeability of the mitochondrial outer membrane for ADP: Implications for the kinetic properties of mitochondrial creatine kinase and for ADP channeling into the intermembrane space. *Mol Cell Biochem* 1994; 133/134: 85-104.

11. Saks VA, Belikova YO, Kuznetsov AV. *In vivo* regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1074: 302-11.

12. Saks VA, Kuznetsov AV, Kupriyanov VV, Miceli MV, Jacobus WE. Creatine kinase of rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 1985; 260: 7757-64.

13. Wallimann T, Eppenberger HM. Localization and function of M-line-bound creatine kinase. M-band model and creatine phosphate shuttle. *Cell Muscle Mot* 1985; 6: 239-85.

14. Ventura-Clapier R, Veksler V, Hoerter JA. Myofibrillar creatine kinase and cardiac contraction. *Mol Cell Biochem* 1994; 133/134: 125-44.

15. Rossi AM, Eppenberger HM, Volpe P, Cotrufo R, Wallimann T. Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca^{2+} uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J Biol Chem* 1990; 265: 5258-66.

16. Minajeva A, Ventura-Clapier R, Veksler V. Ca^{2+} uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase *in situ* strongly depends on bound creatine kinase. *Pflug Arch-Eur J Physiol* 1996; 432: 904-12.

17. Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E, Anfous K. Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* 1998; 184: 231-47.

18. Hoerter JA, Ventura-Clapier R, Kuznetsov A. Compartmentation of creatine kinases during perinatal development of mammalian heart. *Mol Cell Biochem* 1994; 133/134: 277-86.

RÉFÉRENCES

19. Brdiczka D, Wallimann T. The importance of the outer mitochondrial compartment in regulation of energy metabolism. *Mol Cell Biochem* 1994; 133/134: 69-83.
20. Saks VA, Ventura-Clapier R, Aliev MK. Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1274: 81-8.
21. McFarland EW, Kushmerick MJ, Moerland TS. Activity of creatine kinase in a contracting mammalian muscle of uniform fiber type. *Biophys J* 1994; 67: 1912-24.
22. Zeleznikar RJ, Goldberg ND. Kinetics and compartmentation of energy metabolism in intact skeletal muscle determined from O^{18} labelling of metabolite phosphoryls. *J Biol Chem* 1991; 266: 15110-9.
23. Dzeja PP, Zeleznikar RJ, Goldberg ND. Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol Cell Biochem* 1998; 184: 169-82.
24. Katz AM. *Physiology of the heart*. New York: Raven Press, 1992: 71.
25. Veksler VI, Kuznetsov AV, Anflous K, Mateo P, van Deursen J, Wieringa B, Ventura-Clapier R. Muscle creatine kinase-deficient mice. 2. Cardiac and skeletal muscles exhibit tissue-specific adaptation of the mitochondrial function. *J Biol Chem* 1995; 270: 19921-9.
26. Heineman FW, Balaban RS. Control of myocardial oxygen consumption by work. In: Fozzard R, et al., eds. *The Heart and Cardiovascular system*. New York: Raven Press, 1992: 1641-56.
27. Shoubridge EA, Chaliss RAJ, Hayes DJ, Radda GK. Biochemical adaptation in the skeletal muscle of rats depleted of creatine with the substrate analogue β -guanidinopropionic acid. *Biochem J* 1985; 232: 125-31.
28. Mekhfi H, Hoerter J, Lauer C, Wisniewsky C, Schwartz K, Ventura-Clapier R. Myocardial adaptation to creatine deficiency in rats fed with β -guanidinopropionic acid, a creatine analogue. *Am J Physiol* 1990; 258: H1151-8.
29. Tian R, Ingwall JS. Energetic basis for reduced contractile reserve in isolated rat hearts. *Am J Physiol* 1996; 39: H1207-16.
30. van Deursen J, Heerschap A, Oerlemans F, Ruitenbeek W, Jap P, Laak H, Wieringa B. Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity. *Cell* 1993; 74: 621-31.
31. Steeghs K, Benders A, Oerlemans F, de Haan A, Heerschap A, et al. Altered Ca^{2+} responses in muscles with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Cell* 1997; 89: 93-103.
32. Steeghs K, Heerschap A, deHaan A, Ruitenbeek W, Oerlemans F, et al. Use of gene targeting for compromising energy homeostasis in neuro-muscular tissues: the role of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J Neurosci Meth* 1997; 71: 29-41.
33. Boehm E, Veksler V, Mateo P, Lenoble C, Wieringa B, Ventura-Clapier R. Maintained coupling of oxidative phosphorylation to creatine kinase activity in sarcomeric mitochondrial creatine kinase-deficient mice. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 901-12.
34. Ingwall JS. Is cardiac failure a consequence of decreased energy reserve? *Circulation* 1993; 87: VII58-62.
35. Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, Friedrich J, Gwathmey JK, Saks V, Pessina AC, Allen PD. Creatine kinase system in failing and non failing human myocardium. *Circulation* 1996; 94: 1894-901.
36. Veksler V, Ventura-Clapier R. *In situ* study of myofibrils, mitochondria and bound creatine kinases in experimental cardiomyopathies. *Mol Cell Biochem* 1994; 133/134: 287-98.
37. Tian R, Nascimben L, Kaddurah-Daouk R, Ingwall JS. Depletion of energy reserve via the creatine kinase reaction during the evolution of heart failure in cardiomyopathic hamsters. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 755-65.

TIRÉS À PART

R. Ventura-Clapier.

Summary

Creatine kinases and energy transfer in cardiomyocytes

This article is aimed at reviewing important aspects of the role of the creatine kinase (CK) system in cardiac muscle. CK is present in high activity in muscle cells and catalyses the reversible transfer of a phosphate moiety between phosphocreatine and ATP. Four genes encode two cytosolic isoforms (B and M) giving rise to three dimeric isoenzymes (MM, MB and BB) and two mitochondrial forms (one ubiquitous and one present mainly in striated muscles) which can form either dimers or octamers. The expression of these isoforms is tissue specific and developmentally-regulated. CK isoenzymes are compartmentalised within the cell where they fulfill functional and structural roles. In mitochondria, mi-CK is present on the outer face of the inner mitochondrial membrane and functionally coupled to oxidative phosphorylations. MM-CK is either free in the cytosol or bound to the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum, close to the ATPases where it maintains a high ATP/ADP ratio, both kinetically and thermodynamically favouring ATPase activities. In muscle cells, the creatine kinase system including free and bound isoforms and their substrates creatine and phosphocreatine, may fulfill two main roles depending on muscle function and metabolism. In fast muscle, it mainly ensures efficient buffering of ATP and high energy reserve quickly mobilisable for contraction. In oxidative slow and cardiac muscle, mitochondrial, cytosolic and bound CKs ensure the efficiency of energy and signal transfer between the sites of energy production and the sites of energy utilisation as well as their cellular integration. Transgenic mice knocked-out for M or B and mitochondrial CK isoforms show reduced muscle performances, increased muscle oxidative capacities and altered calcium homeostasis. In each animal model or human cardiomyopathy studied so far, alterations in the expression and compartmentation of CK isoenzymes have been reported and appear related to the impairment of the diseased myocardium to mobilise its contractile reserve.